

# KARBOHIDRAT PADA BLASTOKIS MENCIT SELAMA PERIODA PRAIMPLANTASI

S.M.R. Issoegianti\*

## INTISARI

Issoegianti, S.M.R. 1996. Karbohidrat pada Blastokis Mencit selama Periode PraImplantasi. *Biologi*, 2(2): 41—49.

Untuk mengetahui macam karbohidrat yang terdapat pada selubung permukaan sel trofektoderma blastokis mencit pada periode praimplantasi, digunakan teknik mikroskopi fluoresen. Blastokis praimplantasi beserta endometrium yang mengelilinginya diambil dari mencit kehamilan hari ke 4, 5, dan 6.

Sayatan-sayatan empat mikronmeter dari uterus yang berisi blastokis, diinkubasikan di dalam lektin berfluorokrom. Lektin yang digunakan adalah lektin yang bereaksi khusus dengan  $\alpha$ -L-fukosa, N-ac-D glukosamin dan  $\beta$ -D-galaktosa.

Selubung permukaan sel trofektoderma blastokis mencit kehamilan hari ke 4, 5 dan 6 semuanya bereaksi positif dengan lektin yang digunakan. *Inner cell mass* blastokis mencit kehamilan hari ke 6, terlihat memiliki lebih banyak  $\alpha$ -L-fukosa, dan sedikit N-ac-D glukosamin.

*Kata kunci: Blastokis, praimplantasi, glikokaliks, lektin.*

## ABSTRACT

Issoegianti, S.M.R. 1996. Carbohydrates on Trophectoderm of Murine Blastocysts During PreImplantation Period. *Biologi*, 2(2): 41—49.

Fluorescence microscopy technique was applied to identify carbohydrates on the trophoctodermal cell surface coats of murine blastocysts. Murine blastocysts with the surrounding endometrium were collected from mice on day 4, 5 and 6 of pregnancy.

Four micrometer sections of uterus including the blastocysts were exposed to FITC-UEA I, TRITC-WGA and FITC-RCA I, which are specific to  $\alpha$ -L-fucose, Nac-D-glucosamine, and  $\beta$ -D-galactose, respectively.

---

\* Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

The trophoctodermal surface coats of all the blastocysts of mice on day 4, 5 and 6 of pregnancy react positively with all the lectin conjugates. The inner cell mass of blastocysts of mice day 6 of pregnancy contain more  $\alpha$ -L-fucose than the other, and a small Nac-D-glucosamine.

*Key words: Blastocysts, preimplantation, glycocalyx, lectins.*

## PENDAHULUAN

Secara umum interaksi antara beberapa sel yang berdekatan berlangsung di permukaan sel dengan perantaraan molekul-molekul yang berglikosil, yang terletak pada selaput sel. Pada sel hewan, molekul-molekul tersebut merupakan glikoprotein atau glikolipid selaput sel. Karbohidrat yang terikat pada protein atau lipid selaput sel bersama-sama dengan glikosaminoglikan yang berada di permukaan selaput sel, membentuk selubung permukaan yang disebut glikokaliks.

Implantasi blastokis ke endometrium, yang mengakibatkan terbentuknya plasenta hemokorial, juga merupakan interaksi dua macam sel yaitu trofoblast blastokis dan epitelium lumenal uterus. Proses yang terdiri dari dua tahapan ini, yaitu penempelan dan pelekatan, berlangsung di bawah pengaruh hormon estrogen dan progesteron (Fin and Martin, 1974; Psychoyos and Casimiri, 1980). Salah satu peran estrogen dalam

proses ini, yaitu mengaktifkan kelenjar endometrium untuk mensekresikan peptidase yang mampu meluruhkan zona pelusida blastokis (Renfree, 1980). Segera setelah keluar dari zona pelusida, trofektoderma memperoleh kemampuan untuk menempel pada epitelium endometrium (Jenkins, 1977).

Kemampuan menempel ini merupakan sifat intrinsik sel trofektoderma, mengingat bahwa blastokis mampu melekat di tempat-tempat luar uterus. Enders dan Schlafke (1974), menyatakan bahwa permukaan bebas trofektoderma blastokis mencit, pada kehamilan hari ke 4 dan 5 memiliki selubung glikoprotein yang bermuatan negatif. Selubung tersebut, selain bermuatan negatif, menurut Moran dan Rice (1975) berisi pula berbagai macam rantai karbohidrat yang terkait pada protein atau lipid pembentuk selaput sel. Glikoprotein atau glikolipid ini disintesis hanya pada saat-saat tertentu,

sesuai dengan tahap perkembangan blastokis.

Karbohidrat yang terdapat pada glikoprotein selaput sel trofektoderma blastokis sangat bervariasi sesuai jenis hewan maupun tingkat perkembangan blastokis tersebut. Pada manusia, selaput sel trofektoderma blastokis praimplantasi memiliki N-ac-glukosamin. Blastokis babi dan biri-biri, selalu memiliki  $\alpha$ -L-fukosa pada periode praimplantasi (Whyte, 1983; 1984). Chavez (1981) dan Marticorena (1983), menyatakan bahwa pada tahap awal periode praimplantasi, pada kehamilan hari ke 4, selaput sel trofektoderma blastokis mencit memiliki rantai karbohidrat  $\alpha$ -D-manosa,  $\beta$ -D-galaktosa,  $\alpha$ -L-fukosa, dan Nac-glukosamin.

Karbohidrat-karbohidrat tersebut dapat diketahui keberadaannya dengan berbagai macam cara. Salah satu di antaranya, yang sesuai dan baik adalah penggunaan lektin. Lektin tersebut adalah protein yang sebagian besar berasal dari tumbuhan. Senyawa ini bersifat karbohidrat spesifik, satu jenis lektin bereaksi dengan satu macam monokarbohidrat. Lektin dapat digunakan untuk mempelajari keberadaan karbohidrat pada

tempat persinggungan antar sel. Tahap awal implantasi merupakan persinggungan antara jaringan-jaringan *semi allogenic*. Keberadaan karbohidrat di sini kemungkinan berperan pada interaksi jaringan-jaringan janin-induk. Kajian mengenai proses implantasi yang menggunakan lektin belum banyak dilakukan. Pada kesempatan ini dikaji macam dan penyebaran karbohidrat pada blastokis mencit dengan menggunakan lektin dari gandum (WGA), uleks (UEA), dan jarak (RCA).

## BAHAN DAN CARA KERJA

Tiga puluh enam mencit betina dan 9 mencit jantan fertil, galur DDY Takeda diperoleh dari Perusahaan Umum Biofarma Bandung, digunakan dalam penelitian ini. Mencit hamil diperoleh dengan cara mencampur 1 ekor mencit jantan dengan 4 ekor mencit betina di dalam satu kandang. Kehamilan hari 1 ditandai dengan adanya sumbat vagina pada mencit betina. Uterus untuk pembuatan sediaan mikroskopi cahaya biasa maupun fluoresen diambil dari mencit kehamilan hari ke 4, 5, dan 6, yang selanjutnya disebut kelompok I, II, dan III. Lektin yang digunakan berlabel fluorokrom,

berasal dari *Sigma Chemical Co. St. Louis MO*. Yang digunakan adalah TRITC-WGA, FITC-UEA-I, dan FITC-RCA-I.

### **Penentuan dan Pengambilan Daerah Implantasi**

Daerah implantasi mencit kelompok I, secara morfologis belum terlihat. Ada tidaknya blastokis di dalam uterus disesuaikan dengan ada tidaknya korpus luteum di ovarium. Demikian pula jumlah blastokis yang terdapat di uterus dapat diketahui berdasarkan jumlah korpus luteum yang terbentuk. Oleh karena itu, untuk pembuatan sediaan mikroskopis diambil seluruh uterus. Untuk mengetahui daerah implantasi mencit kelompok II secara morfologis/anatomis, mencit disuntik dengan *Evans blue* 1%, 3 jam sebelum dimatikan. Pada daerah implantasi terlihat pita-pita biru. Pada mencit kelompok III, daerah implantasi sudah tampak jelas walaupun tanpa disuntik dengan *Evans blue*. Untuk membuat sediaan mikroskopi dari kelompok II dan III, cukup diambil daerah-daerah implantasi saja.

### **Mikroskopi Cahaya dan Fluoresen**

**Mikroskopi cahaya.** Potongan uterus daerah implantasi mencit kelompok I, II dan III, masing-masing 10 potong difiksasi dengan larutan fiksatif Bouin semalam. Didehidrasi dengan alkohol, ditanam dalam paraplast, kemudian disayat setebal 4  $\mu\text{m}$ . Sayatan diwarnai dengan HE. Akhirnya diamati dan difoto, menggunakan mikroskop *Nikon type 104*.

**Mikroskopi fluoresen.** Potongan uterus daerah implantasi mencit kelompok I, II, dan III, masing-masing 30 potong difiksasi dengan metanol absolut, suhu 4°C semalam. Didehidrasi dengan alkohol, ditanam dalam paraplast, dan disayat setebal 4  $\mu\text{m}$ . Sayatan diinkubasi dalam lektin berfluorokrom, konsentrasi 70  $\mu\text{g/ml}$  dalam 0,1% BSA-PBS, selama 30 menit. Dibilas dengan PBS pH 6.8. Setelah dibilas ditutup dengan medium gliserin-PBS diamati dan difoto dengan mikroskop fluoresen (*Nikon type 104*). Film yang digunakan Fuji, asa empat ratus. Lektin berfluorokrom yang digunakan FITC-UEA-I, TRITC-WGA, dan FITC-RCA-I. Filter untuk FITC adalah B-2A, BA-520, sedangkan untuk TRITC adalah G-2A, BA-590.

Tabel 1. Jumlah mencit dan blastokis yang dikandung

Kelompok	Jumlah mencit bersumbat Vagina sehari pasca kawin	Rerata blastokis per uterus	
		kiri	kanan
I	12 ekor: 3 (-) 9 (+)	4 blastokis 3 menetas	5 blastokis 3 menetas
II	12 ekor: 2 (-) 10 (+)	4 blastokis	3 blastokis
III	12 ekor: 2 (-) 10 (+)	3 blastokis	5 blastokis

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan anatomis/histologis, memberikan fakta bahwa, tidak semua uterus mencit kelompok I, II dan III mengandung blastokis, walaupun sehari sesudah kawin terlihat adanya sumbat vagina pada mencit-mencit tersebut. Keadaan seperti ini sesuatu yang lazim terjadi, mengingat bahwa timbulnya sumbat vagina tidak semata-mata akibat reaksi antara sperma dengan cairan vagina. Tabel I menunjukkan jumlah mencit per kelompok yang mengandung blastokis di dalam uterusnya. Pada kehamilan hari ke 4, beberapa blastokis belum menetas. Hal ini dapat dimengerti, mengingat bahwa waktu ovulasi maupun fertilisasi tidak berlangsung serempak bagi setiap oosit.

Hasil yang diperoleh dari pengamatan mikroskopis cahaya, menunjukkan bahwa blastokis-blastokis dari mencit kelompok I semuanya masih terdapat bebas di lumen uterus, sedangkan blastokis mencit dari kelompok II sudah menunjukkan gejala penempelan. Blastokis dari kelompok tiga, terlihat mulai melekat. Hal ini dapat dilihat pada gambar AI, II dan III. Untuk mikroskopi fluoresen blastokis-blastokis yang direaksikan dengan lektin berfluorokrom hanya dari kelompok II dan III. Bila diamati dengan mikroskop fluoresen terlihat bahwa blastokis-blastokis dari kelompok dua dan tiga, permukaan luar, dan dalam sel-sel trofektoderma serta antar sel *inner cell mass*, memberikan reaksi

positif dengan FITC-UEA I maupun dengan FITC-RCA I. Reaksi positif ditandai dengan warna kuning (terang) (Gambar BII, dan DII). Hal itu berarti bahwa pada glikokaliks sel-sel trofektoderma blastokis-blastokis tersebut terdapat rantai karbohidrat yang terdiri dari  $\alpha$ -L-fukosa dan  $\beta$ -D-Galaktosa.

Pada keadaan ini  $\alpha$ -L-fukosa mungkin digunakan sebagai pemicu penjararan dan perentangan sel-sel trofektoderma pada saat akan menempel dan melekat pada epitelium endometrium. Selain itu, juga digunakan untuk pemampatan blastula, dari berblastocoel besar menjadi berblastocoel sempit, serta pembentukan antigen SSEA-1

sebelum pelekatan ke endometrium (Whyte, 1983; 1984).

Reaksi positif kuat terhadap RCA-I, disebabkan karena blastokis selain glikokaliksnya memiliki rantai  $\beta$ -D-galaktosa, juga mengikat  $\beta$ -D-galaktosa dari endometrium dan menggabungkannya dengan komponen intrasel. Kemampuan mengikat ini, karena adanya reseptor untuk karbohidrat tersebut. Diduga reseptor ini adalah lektin endogen (Chavez et al., 1984).  $\beta$ -D-galaktosa digunakan untuk tumbuh kembang blastokis.

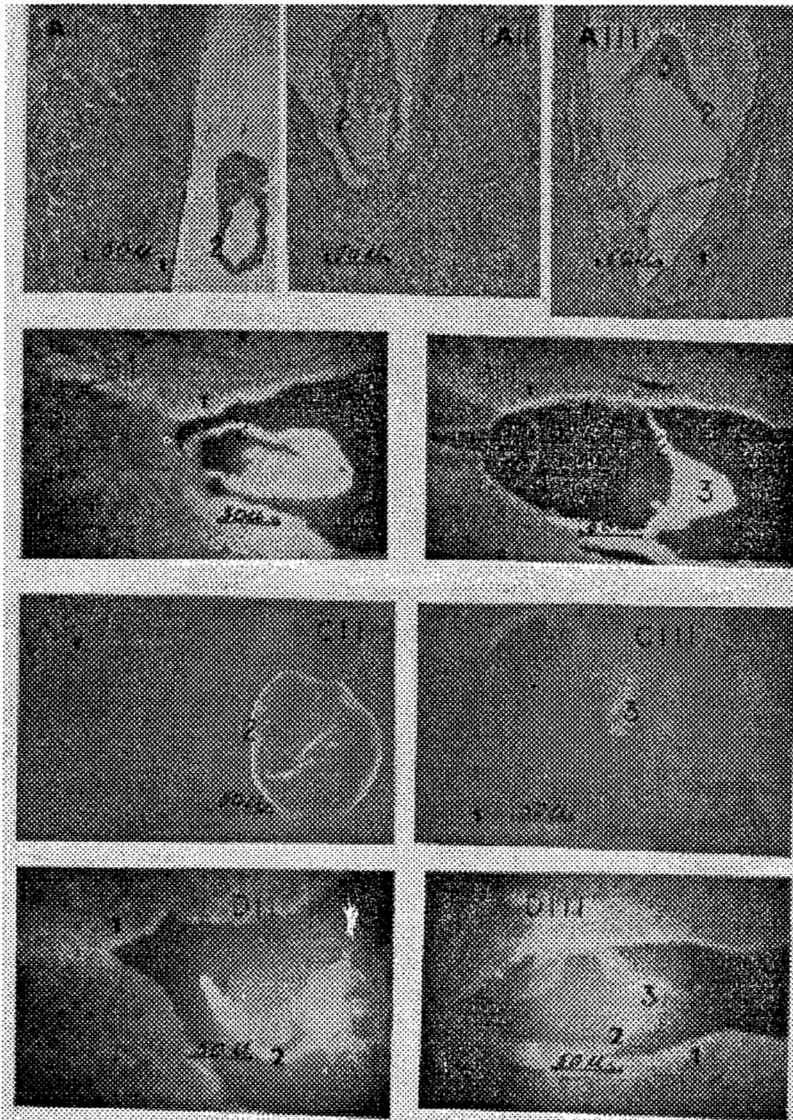
TRITC-WGA bereaksi positif dengan permukaan luar maupun dalam trofektoderma blastokis

Tabel 2. Pengikatan Lektin ke Blastokis Mencit Praimplantasi

Macam lektin	Kelompok Perlakuan	Lokasi Reaksi Lektin			
		Trofektoderm Permukaan Luar	ICM	Trofektoderm Permukaan Dalam	Epitelium Endometrium
FITC-UEA-I	II	+++	++	++	+
	III	+++	++	++	+
TRITC-WGA	II	+	-	-+	-
	III	+	++	-+	-
FITC-RCA-I	II	+++	++	+++	++
	III	+++	++	+++	++

Keterangan:

+= sedikit positif    ++ = positif    +++ = sangat positif



Gambar 1. Lokasi ikatan lektin pada blastokis mencit kelompok I, II, dan III

- A. Kedudukan blastokis. Fotomikrograf cahaya
- B. Blastokis diinkubasi dalam FITC-UEA I
- C. Blastokis diinkubasi dalam TRITC-WGA
- D. Blastokis diinkubasi dalam FITC-RCA I

1. epitelium endometrium, 2. trofektoderma, 3. *inner cell mass*

kelompok II walaupun dengan intensitas berbeda. Permukaan bebas sel-sel *inner cell mass* juga bereaksi positif tetapi, permukaan antar sel tidak (Gambar C.II). Trofektoderma blastokis mencit kelompok III yang bereaksi sedikit positif hanya yang berada di sekitar *inner cell mass*, sedangkan *inner cell mass*, permukaan bebas maupun antar sel bereaksi positif (Gambar C.III). Hal ini menunjukkan bahwa, sintesis substansi yang mempunyai N-ac-glukosamin disintesis menjelang saat implantasi. Perubahan tempat reaksi positif memberikan informasi bahwa terjadi perubahan struktur komponen selaput sel. Hubungan antara karbohidrat ini dengan interaksi janin-induk belum diketahui dengan pasti. Namun, diduga memegang peran penting dalam pengaturan tanggapan imunologis induk terhadap embrio. Rangkuman reaksi lektin blastokis tersaji pada Tabel 2.

## KESIMPULAN

Berdasarkan uraian di atas dapat disimpulkan bahwa, pada blastokis kehamilan hari ke 5 dan 6 masih terdapat  $\alpha$ -L-fukosa, N-ac-glukosamine dan  $\beta$ -D-galaktosa. Keberadaan  $\alpha$ -L-Fukosa memungkinkan blastokis tidak ditolak oleh

jaringan induk, sedangkan keberadaan  $\beta$ -D-galaktosa untuk perbanyakkan ICM (*inner cell mass*). Demikian pula, N-ac-glukosamin membantu perbanyakkan ICM.

## PUSTAKA ACUAN

- Chavez, D.J. and A.C. Enders. 1981. Temporal changes in lectin binding of preimplantation mouse blastocysts. *Dev. Biol.*, 87: 267.
- Chavez, D.J., A.C. Enders and S. Schlafke. 1984. Trophoctoderm cell subpopulations in the peri-implantation mouse blastocyst. *J. Exp. Zool.*, 131: 267-271.
- Enders, A.C. and S. Schlafke. 1974. Surface Coats of the Mouse Blastocyst and Uterus during the Preimplantation Period. *Anat. Rec.*, 180: 31-46.
- Finn, C.A. and L. Martin. 1974. The control of implantation. *J. Reprod. Fertil.*, 39: 195-206.
- Martcorena, P., B. Hogan, A. Dimeo, K. Artz and D. Bennett. 1983. Carbohydrate changes in pre and peri-implantation mouse embryos as detected by a monoclonal antibody. *Cell Differentiation*, 12: 1-10.



- Moran, D. and R.W. Rice. 1975. An ultrastructural examination of the role of cell membrane surface coat material during neurulation. *J. Cell Biol.*, 64: 172-186.
- Psychoyos, A. and V. Casimiri. 1980. Factors involved in uterine receptiveness and refractoriness. *Prog. Reprod. Biol.*, 7: 143-157.
- Renfree, M.B. 1982. Secondary Metabolism and Biotransformation. In: *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals*, E.J. Staba (ed.). CRC. Press, Inc., Boca Raton, Florida. p.: 61569.
- Whyte, A. 1983. Biochemistry of the human syncytiotrophoblast plasma membrane. In: *Biology of Trophoblast* (Ed.) Loke. Y.W. & Whyte, A. Amsterdam, Elsvier Biochemical Press. pp.: 513-533
- Whyte, A. and T. Robson. 1984. Saccharides Localized by Fluorescent Lectins on Trophoctoderma and Endometrium Prior to Implantation in Pigs, Sheep and Equids. *Placenta*, 5: 533-540.